

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ  
МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ ЭКСТРАКТА МИЦЕЛИЯ  
И КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *PLEUROTUS OSTREATUS***

*А.В. Жуков, 4 курс; В.С. Быков, 3 курс; В.В. Сакович, аспирант*

*Научный руководитель – Д.Д. Жерносеков, к.б.н., доцент*

*Полесский государственный университет*

**Введение.** Протеолитические ферменты широко применяются в различных отраслях пищевой промышленности. Однако в последнее время крупномасштабное производство ферментов животного происхождения сталкивается с большими трудностями из-за ограничения сырьевой базы. Поэтому поиск новых продуцентов протеиназ является актуальной проблемой для биотехнологического производства. Одной из перспективных групп являются базидиальные грибы, среди которых имеются активные продуценты молокосвертывающих протеиназ. Так, в культуральном фильтрате вешенки обыкновенной обнаружены протеиназы, способные створаживать молоко [3, с.114]. Данный вид гриба выращивается по всему миру, не токсичен, а его плодовые тела перспективны для всестороннего исследования, поскольку являются относительно дешевым и удобным сырьем для получения ферментных препаратов. В настоящее время проводится активный поиск подходов для получения сычужных ферментов, способных обеспечить лучший выход продукта и высокую ферментативную активность. Выделение, очистка и изучение свойств этих грибных энзимов является необходимым вектором не только для современной биотехнологии как науки, но является важным и для пищевой промышленности. Производство и внедрение отечественных ферментных

препаратов грибного происхождения в различные отрасли промышленности заметно сократит расходы на приобретение таковых за рубежом. Целью нашей работы является разработка первичных методов очистки сычужных ферментов культуральной жидкости и экстракта мицелия *Pleurotus ostreatus*.

**Материалы и методы исследований.** Эксперименты выполнены на «диком» штамме *P. ostreatus*. В ходе исследований использовали картофельно-сахарозную среду. Инокулом вводили в виде фрагментов ковра сток-культуры мицелия площадью 1 см<sup>2</sup>. Культивировали в течение 14 дней в темноте при температуре 27 °С на шейкере модели WiseShakeSHO (Корея) при 70 об/мин. По окончании инкубации отбирали культуральную жидкость и замораживали. Мицелий экстрагировали дистиллированной водой, гомогенизировали, центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом [1, с.847].

Молокосвертывающую активность (МСА) определяли по общепринятой методике, описанной в работе [4]. Активность препарата оценивали по времени образования плотного молочного сгустка. За единицу МСА принимали количество фермента, которое сворачивает 100 мл молока за 40 мин при 35 °С [4].

Общую протеолитическую активность (ПА) определяли по лизису желатина в тонком слое агарового геля. Объем образца, наносимого на белок-агаровые пластины составлял 10 мкл. Активность препарата рассчитывали, измеряя площадь белок-агаровых пластин с гидролизированным субстратом вокруг каждой лунки. За 1 единицу активности (Е) фермента принимали такую активность, которая обуславливает гидролиз субстрата на участке геля размеров 1 см<sup>2</sup> [2].

Для очистки сычужных ферментов из культуральной жидкости применялся метод высаливания с использованием разных солей: сульфата аммония и хлорида натрия. Для удаления соли применялся метод диализа.

#### **Результаты исследований и их обсуждение.**

Нами подобраны условия для высаливания ферментов, обладающих МСА. Наилучший результат дало полное насыщение раствора хлоридом натрия, температура 4 °С, pH 4,7, перемешивание 60 об/мин и 12 ч. Условия диализа были установлены экспериментально: температура 4 °С, перемешивание 60 об/мин и 20 ч. Для этих этапов очистки был подобран оптимальный буферный раствор: 0,1 М ацетатный буфер pH 4,7. При данном значении pH полностью сохраняется активность ферментов. Первый этап очистки ферментного препарата из культуральной жидкости позволил сохранить практически всю исходную молокосвертывающую активность, что показано в таблице 1.

Таблица 1 – Очистка молокосвертывающих ферментов культуральной жидкости *P. ostreatus* методом осаждения хлоридом натрия

Фракция	Объем, мл	Белок мг/мл	МСА во фракции, ед/мл	Общая МСА	Удельная МСА	Степень очистки
Культуральная жидкость	200	0,185	5	1000	27	1
Осаждение хлоридом натрия	50	0,22	5	250	22,7	0,84

Активность протеолитических ферментов также была сохранена (таб.2)

Таблица 2 – Очистка протеолитических ферментов культуральной жидкости *P. ostreatus* методом осаждения хлоридом натрия

Фракция	Объем, мл	Белок мг/мл	ПА во фракции, ед/мл	Общая ПА	Удельная ПА	Степень очистки
Культуральная жидкость	200	0,185	16,4	3280	88,65	1
Осаждение хлоридом натрия	50	0,22	15,2	760	69,1	0,78

В наших экспериментах экстракт мицелия обладал незначительной молокосвертывающей активностью, которая не сохранилась при первичной очистке. Однако, протеолитическую активность удалось сохранить практически полностью, что видно из таблицы 3.

Таблица 3 – Начальные этапы очистки протеолитических ферментов экстракта мицелия *P. Ostreatus*

Фракция	Объем, мл	Белок мг/мл	ПА во фракции, ед/мл	Общая ПА	Удельная ПА	Степень очистки
Экстракт мицелия	200	1,05	21,5	4300	20,48	1
Осаждение хлоридом натрия	50	1,18	22,9	1145	19,4	0,947

В дальнейшем ферментный препарат из *P. ostreatus* будет сконцентрирован методом лиофильного высушивания и очищен методом ионообменной хроматографии.

**Заключение.** Были подобраны условия начального этапа очистки ферментных препаратов из культуральной жидкости и экстракта мицелия *P. ostreatus*, которые позволили сохранить молокосвертывающую активность в очищенном препарате.

#### Список использованных источников

1. Salehi, M. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withaniacoagulans* fruit / Mahmoud Salehi, Mahmoud RezaAghamaali, Reza H.Sajedi, S. MohsenAsghari, EisaJorjani// International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – Vol. 98. – P. 847-854.
2. Дьяконова, Г. В. Исследование некоторых физико-химических свойств молокосвертывающих ферментов вешенки обыкновенной: автореф. диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 03.01.04 ВАК РФ, биохимия. / Г.В. Дьяконова; Кубанский государственный аграрный университет. Ростов-на-Дону – 2010 – 44 с.
3. Лебедева, Г.В. Выделение и характеристика фермента сычужного действия из плодовых тел вешенки обыкновенной / Г.В. Лебедева, М.Т. Проскуряков, М.А. Кожухова // Пищевая химия, 2008 – 114 с.
4. Пятницкий Н.П., Проскуряков М.Т. Определение активности химотрипсина по скорости створаживания молочно-ацетатной смеси // Материалы 17-й науч. конф. физиологов Юга России. Том 2. – Ставрополь, 1969. – 80 с.